



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/12, 15/57, 9/64, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 39/395, 38/48, 31/70		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/64587</b>
			(43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PC1/FR99/01326		(74) Mandataire: LANCELOT, Géraldine; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).	
(22) Date de dépôt international: 4 juin 1999 (04.06.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/07068 5 juin 1998 (05.06.98) FR 60/122,599 31 mars 1999 (31.03.99) US		(81) Etats désignés: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RHOLAM, Mohamed [MA/FR]; 2, rue E. Bousseau, F-60600 Clermont (FR). MUNOZ-GIMENEZ, Noëli [ES/FR]; 53, rue du Chemin de Fer, F-94190 Villeneuve Saint Georges (FR). MOUTAOUAKIL, Mohamed [FR/FR]; 5, allée de l'Ile Marante, F-92700 Colombes (FR). COHEN, Paul [FR/FR]; 16, rue Barbette, F-75003 Paris (FR). BERTRAND, Philippe [FR/FR]; 16, rue du Commandant l'Herminier, F-94240 L'Hay-les-Roses (FR).			
(54) Title: POLYPEPTIDES WITH BETA-SECRETASE TYPE ACTIVITY			
(54) Titre: POLYPEPTIDES POSSEDANT UNE ACTIVITE DE TYPE BETA-SECRETASE			
(57) Abstract			
The invention concerns novel peptides and their pharmaceutical use. More particularly, the invention concerns novel polypeptides having a $\beta$ -secretase type activity characterised in that they are capable of specifically cleaving the natural $\beta$ -amyloid peptide precursor (APP).			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides possédant une activité de type $\beta$ -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide $\beta$ -amyloïde (APP).			

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bразил	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

POLYPEPTIDES POSSEDANT UNE ACTIVITE DE TYPE  $\beta$ -SECRETASE

5 La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides possédant une activité de type  $\beta$ -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP).

10 Les individus atteints par la maladie d'Alzheimer présentent des symptômes caractéristiques d'altérations de la mémoire, de perte des capacités intellectuelles et des fonctions cognitives. Ces changements pathologiques s'accompagnent d'une atrophie neuronale, d'une déplétion importante d'un certain type de récepteurs et également d'une réduction des connexions synaptiques. Ce syndrome comporte la  
15 présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires en quantités très importantes, principalement dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le noyau amygdalien et dans les vaisseaux sanguins corticaux.

Les plaques dites séniles sont des structures sphériques qui s'établissent lentement sur une dizaine d'années dans les espaces extracellulaires de l'hippocampe,  
20 du cortex et d'autres régions cérébrales. Leur constituant majeur est le peptide  $\beta$  amyloïde ( $A\beta$ ) associé à d'autres protéines anormales. Ces structures sont entourées par des axones et des neurones anormaux.

Les dégénérescences neurofibrillaires sont dues à une accumulation de faisceaux denses de fibres anormales dans le cytoplasme de certains neurones et  
25 principalement des cellules pyramidales du cortex. Ces enchevêtrements neurofibrillaires sont constitués d'une forme particulière de la protéine tau qui, associée à d'autres protéines, donne des paires de neurofilaments hélicoïdaux qui perturbent la conduction de l'influx nerveux.

Des formes familiales de cette maladie ont été répertoriées et semblent résulter de modifications génétiques variées qui toutes provoquent l'accumulation anormale du peptide A $\beta$ . Ces dernières, très hétérogènes, ont été en particulier associées à diverses mutations sur les chromosomes 1,14 et 21. Ce dernier a d'autant plus suscité l'intérêt qu'il porte le gène codant pour la protéine précurseur du A $\beta$ . On comprend donc l'apparition précoce (55 ans) de la maladie d'Alzheimer chez les

sujets atteints du Syndrome de Down (trisomie 21).  
Il est à noter que les individus affectés par des formes familiales de la maladie ne représentent qu'un faible pourcentage parmi les sujets atteints.

Dans la quasi-totalité des cas de maladie d'Alzheimer non liés aux formes familiales, les individus âgés de plus de 70 ans présentent des plaques séniles dans diverses régions du cerveau. Leur répartition est en revanche différente selon le type de démence concernée.

D'une masse moléculaire de 4 kDa, le peptide A $\beta$  humain est généré par clivages protéolytiques de son précurseur (APP) aux sites Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> et Val<sup>636</sup>-Ile<sup>637</sup>. La molécule libérée est constituée de 39 (à 42) acides aminés dont la séquence protéique est la suivante :

10
20
30
40  
 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA

En solution aqueuse, ce peptide adopte un arrangement tridimensionnel de type feuillet  $\beta$  plissé. Sa partie COOH-terminal très hydrophobe lui confère des propriétés d'aggrégation dont le taux d'oligomérisation est fonction du pH (formation maximale à pH=5.4) et de la concentration du peptide. De plus, la séquence comprise entre les résidus Gly<sup>25</sup> et Met<sup>35</sup> confère à ce peptide des propriétés neurotrophiques et neurotoxiques.

Le peptide A $\beta$  est un produit naturel sécrété par les cellules et détectable dans le sang et le liquide cérébro-spinal. Bien que ce peptide soit neurotoxique, sa production n'est cependant pas suffisante à la formation des plaques amyloïdes. Un

"processing" altéré ou une surexpression de son précurseur prédisposeraient au dépôt du A $\beta$  dans le cerveau.

Le transcrit primaire du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP) subit un épissage alternatif pour générer des ARNm codant pour au moins 5 isoformes de 563, 695, 714, 751 et 770 acides aminés (a.a.), exprimées de façon ubiquitaire dans les  
5 tissus et dont le taux diffère suivant le type cellulaire.

Les isoformes APP695 et 751 sont cependant restreintes exclusivement au système nerveux central et périphérique (notamment au niveau des synapses dans les astrocytes et des neurones) où ils peuvent jouer un rôle dans l'activité physiologique des synapses. Les isoformes APP751, APP563 et APP770 contiennent un "insert" de  
10 56 a.a. homologue à l'inhibiteur de protéase de type "Kunitz". Par ailleurs, la forme sécrétée de l'APP751 est identique à la nexine II, un inhibiteur de protéase impliqué dans la régulation des sérines protéases extracellulaires.

L'APP est une glycoprotéine d'environ 120 kDa présentant les caractéristiques  
15 d'un récepteur de surface de type II. Bien que la fonction réelle de l'APP n'ait pas encore été élucidée, des études ont montré que cette glycoprotéine pourrait jouer un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire ainsi que dans les interactions d'adhésion dans l'inflammation, la régénération et la réponse immunitaire.

20 Toutes les isoformes de l'APP sont insérées dans le réticulum endoplasmique grâce à leur séquence "signal". Le précurseur est ensuite ciblé vers l'appareil de Golgi où il subit différentes modifications post-traductionnelles pour être ensuite ancré dans la membrane. Sous l'action de différentes protéases, l'APP peut alors y subir divers clivages (voir figure 1), dont certains sont majoritaires :

25 L'activité protéasique, appelée  $\alpha$ -secrétase, clive à l'intérieur de la séquence A $\beta$  entre les résidus Lys<sup>612</sup> et Leu<sup>613</sup> de l'APP695 pour générer un fragment NH<sub>2</sub>-terminal sécrété (désigné sAPP $\alpha$  : APP $\alpha$  soluble) et contenant les 16 premiers a.a. du A $\beta$ .

L'activité protéasique, appelée  $\beta$ -secrétase, clive la liaison peptidique du doublet Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> au sein du précurseur pour libérer un fragment APP NH<sub>2</sub>-terminal secrété (désigné sAPP $\beta$ : APP $\beta$  soluble) délété totalement du A  $\beta$ .

La 3<sup>ème</sup> activité protéasique, appelée  $\gamma$ -secrétase, pourrait aussi agir entre les  
5 résidus Val<sup>636</sup> à Ile<sup>637</sup> du précurseur pour générer une proforme secrétée APP $\gamma$  contenant le A  $\beta$ .

Le constituant majeur des plaques séniles, qui apparaissent aussi bien dans les formes familiales que non familiales de la maladie d'Alzheimer est le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ).

10 Le peptide A $\beta$  résulte du clivage de son précurseur, l'APP, au site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> de l'APP selon une activité protéasique de type  $\beta$ -secrétase et au site Val<sup>636</sup>-Ile<sup>637</sup> selon une activité protéasique de type  $\gamma$ -secrétase.

Parmi les formes les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, une mutation en relation avec le site de clivage  $\beta$ -secrétase a été identifiée. Il s'agit de la  
15 double mutation "suédoise" de l'APP (Lys<sup>595</sup>-Met<sup>596</sup>  $\Rightarrow$  Asn-Leu dans l'APP695) et qui présente une production accrue du peptide A $\beta$  (donc une augmentation de la maturation de l'APP en faveur de la voie amyloïdogénique).

Cependant, il n'en demeure pas moins que dans la très grande majorité des cas de maladie d'Alzheimer, l'APP est dans sa forme naturelle avec un site de clivage  $\beta$ -  
20 secrétase non muté.

Certaines protéases issues de l'homme, du rat ou du singe ont été étudiées par divers auteurs et sont supposées être impliquées dans la maturation du précurseur APP. Parmi ces enzymes on peut citer tout particulièrement les sérine protéases 1 et 2 (Abraham et al. (1991), Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 790-796; Matsumoto  
25 et al. (1994), Biochemistry, 33, 3941-3948; Matsumoto et al. (1994), Neurosciences Letters, 195, 171-174) ainsi que la Cathepsine G-like (Razzaboni et al. (1992), Brain Research, 589, 207-216). Ces enzymes d'origine humaine ou simienne, clivent au niveau du site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> de l'APP selon une activité protéasique de type  $\beta$ -

secrétase, cependant, elles ont été mises en évidence ou partiellement purifiées à partir de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

Etant donné que la formation du peptide  $\beta$ -amyloïde résulte de l'action d'enzyme de type  $\beta$ -secrétase sur l'APP, on comprend l'importance de l'identification et de la caractérisation de système(s) enzymatique(s) de type  $\beta$ -secrétase responsable(s) sélectivement de la maturation post-traductionnelle du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde au niveau du site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> dans les cellules humaines ne provenant pas de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. La connaissance de ces nouveaux systèmes enzymatiques permettent ainsi d'envisager la préparation de nouvelles molécules utilisables pharmaceutiquement et notamment capables d'intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde dans des formes non familiales de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention résulte donc de l'identification et de la caractérisation par la demanderesse de polypeptides possédant une activité catalytique vis-à-vis du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP) de type  $\beta$ -secrétase. Au contraire des autres protéases identifiées, les polypeptides de la présente invention ont une spécificité d'action envers la forme naturelle de l'APP. La présente invention découle en particulier de la mise en évidence d'un polypeptide de 70 kDa, capable de cliver les formes non mutées de l'APP.

Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides ou leurs variants possédant une activité de type  $\beta$ -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP).

Au sens de la présente invention, le terme variant désigne toute molécule ayant la même activité que les polypeptides de l'invention, obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion,

addition, et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels variants peuvent être générés dans des buts différents, tel que celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance aux protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les  
5 variants résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à l'extrémité. Le terme variant comprend également des polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'autres organismes.

10 Le substrat que clivent les polypeptides de l'invention ne présente pas de mutation dans sa séquence peptidique et en particulier le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde ne porte pas la double mutation suédoise. Les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont capables de cliver sélectivement la liaison peptidique du doublet Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> au sein de la forme native ou naturelle de l'APP. En particulier, les  
15 polypeptides de l'invention ne clivent pas les formes d'APP ayant la mutation suédoise (Lys<sup>595</sup>-Met<sup>596</sup>  $\Rightarrow$  Asn-Leu). Cette dernière ayant été mise en évidence à partir de prélèvements réalisés sur le cerveau de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

Les polypeptides selon l'invention ont été purifiés à partir de cellules humaines de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer et sont capables de cliver  
20 exclusivement l'APP dans sa forme naturelle au niveau de la liaison peptidique du doublet Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup>.

Les polypeptides de l'invention sont caractérisés en ce que leur activité n'est pas dépendante d'un second substrat et/ou d'un ligand. On peut citer à titre d'exemples les ions et plus particulièrement des cations tels que les cations magnésiques ou  
25 calciques. En effet, d'autres protéines comme les sérines protéases 1 et 2 ou la Cathepsine G-like ayant une activité protéasique, nécessitent la présence du calcium pour être actives.



Les polypeptides selon l'invention possèdent une masse moléculaire comprise entre 65 et 75 kDa et préférentiellement leur masse moléculaire est d'environ 70 kDa. Leur point isoélectrique est compris entre 6.0 et 7.0 et de préférence est égal à 6.0.

Ces polypeptides sont des endopeptidases de la famille des sérines protéases.

- 5 Préférentiellement, ces endopeptidases sont de type chymotrypsine sensible. En effet, le profil d'inhibition montre que ces endopeptidases sont totalement inhibées par le PMSF (Phenylmethane-sulfonyl fluoride) et partiellement inhibées par le pepablock, le TPCK(L-1-Chloro-3-[4tosylamido]-4-phenyl-2-butanone), la benzamidine. En outre, elles sont totalement résistantes à l'inhibition par l'antipapaïne.

- 10 Les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont caractérisés par une activité  $\beta$ -secrétase maximale à un pH compris entre 7 et 8.

- L'invention a également pour objet des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques capables de cliver au site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde. De tels composés sont obtenus par reproduction des motifs actifs
- 15 du polypeptide selon l'invention par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques et qui soient compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation de polypeptides tels que décrits ci-avant pour la préparation de molécules non peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des
- 20 éléments structuraux de ces polypeptides qui sont importants pour leur activité et la reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

- Selon une variante de l'invention, les polypeptides ou leurs variants
- 25 comprennent en outre une séquence signal permettant une localisation cellulaire précise. Parmi les séquences utilisables, on peut citer de manière préférée, la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des

sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux etc...

Un autre objet de l'invention consiste en un procédé de purification enzymatique des polypeptides de l'invention, possédant une activité de type  $\beta$ -secrétase et capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel de l'APP.  
5 Ce procédé comporte les étapes suivantes :

- le surnageant de la culture cellulaire est tout d'abord concentré sur membranes.

- le produit de concentration subit ensuite les différentes étapes de la  
10 purification avec notamment une centrifugation sur membrane tangentielle suivie d'une chromatographie d'exclusion et d'une chromatographie échangeuse d'ions puis d'une chromatographie d'interactions hydrophobes et enfin d'une nouvelle chromatographie d'exclusion.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une lignée  
15 cellulaire. Cette lignée a été sélectionnée parmi de nombreuses autres lignées humaines (voir Matériel et Méthodes) provenant d'origines diverses mais de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer. Ces lignées ont été utilisées pour la recherche des polypeptides de l'invention ou de leurs variants. Ainsi, ces lignées cellulaires humaines sont représentatives du Système Nerveux Central ou Périphérique et du  
20 Système Immunitaire et sont capables de réaliser le métabolisme normal du précurseur du peptide  $\beta$  amyloïde conduisant à sa production. De manière préférée la lignée cellulaire sélectionnée est la lignée THP1 (ATCC TIB 202) issue de monocyte.

Les lignées cellulaires décrites précédemment sont notamment utilisées  
comme hôte pour la mise en évidence de composés (ligands, antagonistes, agonistes)  
25 capables d'inhiber l'interaction entre les polypeptides de l'invention et leur substrat.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide de l'invention ou de l'un de ses variants puis par prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art. Les anticorps ou fragments d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour leur faculté à inhiber, au moins en partie, l'interaction entre le dit polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou pour d'inhiber au moins en partie l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptidés de l'invention vis-à-vis du précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde. En particulier, ces anticorps sont utilisés comme médicament, notamment pour le traitement de maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables d'inhiber, au moins en partie, l'interaction du polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou de moduler ou d'inhiber au moins en partie l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention.

La mise en évidence et/ou l'isolement de tels composés est réalisé selon les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que exprimant un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention. A partir de ces molécules agonistes ou antagonistes, il est possible par des techniques classiques connues de l'homme du métier et notamment  
5 par séquençage d'obtenir leurs séquences nucléotidiques correspondantes.

Ainsi selon une variante de l'invention, il peut être particulièrement avantageux de faire exprimer in situ des molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention à partir de leurs séquences nucléotidiques. La préparation de ces molécules et leur expression in vivo, ex-vivo et/ou in vitro, nécessitent que  
10 leurs séquences nucléotidiques soient portées par un vecteur viral ou plasmidique et soient transfectées au moyen dudit vecteur dans des cellules hôtes appropriées.

La présente invention concerne également l'utilisation des polypeptides définis précédemment ou de leurs variants pour la mise en évidence de ligands ainsi que de composés capables d'inhiber, au moins en partie, l'interaction entre le  
15 polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou d'intervenir dans la métabolisme du précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou de ralentir la production du peptide  $\beta$ -amyloïde.

En effet, la présente invention se rapporte également à une méthode de mise  
20 en évidence de molécules pouvant influencer l'activité des polypeptides de l'invention.

Cette méthode de "screening" comporte les étapes suivantes :

- on met en contact les polypeptides de l'invention qui présentent une activité de type  $\beta$ -secrétase avec une molécule ou un mélange contenant différentes  
25 molécules, éventuellement non identifiées.

- on met en contact le mélange réactionnel décrit dans l'étape précédente avec le substrat des polypeptides de l'invention qui est préférentiellement l'APP dans sa forme naturelle

- on mesure l'activité  $\beta$ -secrétase sur l'APP
- on détecte et/ou on isole les molécules qui ont eu un effet sur l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs de par leur capacité à interférer au niveau de l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention vis-à-vis du précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde peuvent, en effet, permettre de traiter certaines affections neurologiques et notamment la maladie d'Alzheimer.

10 L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif soit un polypeptide tel que défini ci-avant soit les molécules agonistes, antagonistes ou ligands définis précédemment.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini  
15 ci-avant, et/ou un oligonucléotide antisens.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps, ligands et/ou séquences nucléotidiques définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées  
20 pour inhiber au moins en partie l'interaction des polypeptides de l'invention ou de leurs variants avec le précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou pour inhiber au moins en partie l'activité  $\beta$ -secrétase et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide  $\beta$ -amyloïde. Il s'agit plus préférentiellement de compositions pharmaceutiques  
25 destinées au traitement de maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation des molécules décrites auparavant (ligands, anticorps ou fragments d'anticorps, antagonistes, agonistes) pour inhiber au moins en partie l'interaction des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et du précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou pour inhiber, au moins  
5 en partie, l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide  $\beta$ -amyloïde. De manière préférée l'utilisation de ces molécules est envisagée comme médicament, notamment pour le traitement des maladies neurodégénératives et en particulier pour le traitement de la maladie  
10 d'Alzheimer.

Selon une variante de l'invention, les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont utilisés pour intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les polypeptides ou leurs variants définis ci-avant sont utilisés pour mettre en évidence des ligands ou des  
15 composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre les polypeptides de l'invention ou leurs variants et le précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou pour inhiber, au moins en partie, l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide  $\beta$ -amyloïde.

20 Pour leur utilisation selon la présente invention, les polypeptides de l'invention et surtout leurs antagonistes, agonistes, anticorps et ligands sont préférentiellement associés à un ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour être formulés en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire,  
25 transdermique, etc. Ils sont de préférence utilisés sous une forme injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par

addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

La présente invention sera plus amplement détaillée à l'aide des exemples ci dessous considérés de manière descriptive et non limitative.

5

### **Légende des figures**

10

Figure 1 : Topographie et sites de clivage de l'APP.

Figure 2 : description du procédé de purification des polypeptides de l'invention.

Figure 3 : analyse par immunoblot du clivage par les polypeptides de l'invention des précurseurs complets d'origine membranaire du peptide  $\beta$ -amyloïde "normal" (APP-  
15 K<sup>595</sup>M<sup>596</sup>) et "double muté" (APP- N<sup>595</sup>L<sup>596</sup>). Mise en évidence de la spécificité de clivage des polypeptides de l'invention envers le précurseur d'origine membranaire du peptide  $\beta$ -amyloïde "normal" (APP- KM).

Pour chacun des précurseurs (APP-NL et APP-KM), la colonne 1 représente les membranes non incubées sans enzyme, la colonne 2 représente les membranes  
20 incubées à 37° C sans enzyme, alors que la colonne 3 correspond aux membranes incubées à 37° C avec les polypeptides de l'invention présentant une activité de type  $\beta$ -secrétase.

25

## **MATERIELS ET METHODES**

30

**Origine des lignées cellulaires**

On a utilisé 13 lignées cellulaires humaines d'origine variée pour la recherche des enzymes de maturation:

**Système nerveux central**

5	SW 1088	ATCC HTB 12	Astrocytome
	SW 1788	ATCC HTB 13	Astrocytome
	U-138 MG	ATCC HTB 16	Glioblastome
	U-373 MG	ATCC HTB 17	Glioblastome, astrocytome, grade III

**Système nerveux périphérique**

10	HMCB	ATCC CRL 9607	Bowes melanoma
	Hs27	ATCC CRL 1634	Newborn foreskin
	MRC5	ATCC CCL 171	Lung, diploid

**Système immunitaire**

15	DAKIKI	ATCC TIB 206	B-cell, Ig A secreting
	H9	ATCC HTB 176	T-cell lymphoma
	IM-9	ATCC CCL 159	Lymphoblast, Ig secreting
	K-562	ATCC CCL 243	Chronic myelogenous leukemia
	RPMI 1788	ATCC CCL 156	Peripheral blood, IgM secreting
20	THP1	ATCC TIB 202	Monocyte

**Culture Cellulaire**

Après décongélation, les cellules, selon leur origine, sont mises en culture soit dans le milieu «DMEM» soit dans le milieu «RPMI 1640» en présence de 10% de sérum de veau foetal. Ces cultures ont été réalisées dans des flacons de 1 litre à 37°C avec un renouvellement des milieux de cultures tous les 2 à 3 jours. Selon la lignée cellulaire étudiée, une période de 2 à 5 mois est nécessaire pour obtenir un volume de 18 litres de milieu de culture. La dernière étape de culture se fait pendant 48 heures en absence de sérum de veau foetal et de rouge de phénol. Ces cultures cellulaires sont ensuite centrifugées pour récupérer le surnageant qui servira à la purification des enzymes.

Les lignées cellulaires HMCB, U-373 MG, U-138 MG, MRC5 et Hs27 ont été cultivées dans le milieu «DMEM» alors que les lignées SW 1088, SW 1783, K-562, H9, DAKIKI, THP1, RPMI 1788 et IM-9 l'ont été dans le milieu «RPMI 1640».

**Purification enzymatique**



Les 18 litres de surnageant de chaque culture cellulaire sont concentrés sur membranes ULTRASETTE™ (FILTRON) ayant un seuil de coupure de 10kDa, puis le produit de concentration obtenu a servi à la purification des activités protéolytiques selon le protocole suivant:

- 5 - La première étape consiste en une centrifugation sur membrane tangentielle à 7000 rpm. Plus particulièrement, la concentration est réalisée sur membrane ULTRAFREE® (MILLIPORE) ayant un seuil de coupure de 10kDa
- Puis il est procédé à une chromatographie d'exclusion. Suivant un mode particulier de l'invention la chromatographie d'exclusion a été réalisée sur colonne séphacryl S-100 (Pharmacia) dont les limites d'exclusion sont  $10^3$  Da et  $10^5$  Da.
- 10 - Une chromatographie d'échange d'ions représente la troisième étape du procédé. Il a été utilisé notamment une colonne Q-sépharose (Pharmacia) dont le gel est constitué d'anions forts. La colonne est éluée par un gradient salin de 0 à 1 M en utilisant le solvant A (Tris 25mM, pH 7.5) et le solvant B (Tris 25mM, NaCl 1M, pH 7.5).
- 15 - L'avant dernière étape consiste en une chromatographie d'interactions hydrophobes, en particulier sur colonne phényl-sepharose-6 (Pharmacia) ayant un haut degré de substitution (40µmol/g de gel). Cette colonne a été éluée avec un gradient de sulfate d'ammonium de 1 à 0 M en utilisant le solvant A (Tris 25mM,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  1 M, pH 7.5) et le solvant B (Tris 25mM, pH 7.5).
- 20 - Enfin, la dernière étape est une chromatographie d'exclusion, réalisée en particulier sur colonne TSKgel G2000SW (Interchim) dont le gel est constitué de supports rigides de silice, greffés avec un groupement hydrophile. L'éluant est un tampon Tris 25mM, pH 7.5 contenant 250mM NaCl.

#### 25 Tests enzymatiques

Le suivi des activités  $\beta$ -secrétase a été réalisé par des tests utilisant différents peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du précurseur APP au niveau du site de clivage enzymatique de type  $\beta$ -secrétase (Tableau 1).

Pour la réalisation du peptide chromophore, 5 µl de peptide Z-Val-Lys-Met-MCA (7-amino-6-methylcoumarin), dilué au 1/1000, sont incubés avec 5 µl de surnageant pendant 6 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 3 µl de HCl 0,1N, et l'activité enzymatique est déterminée par une mesure de la fluorescence du chromophore AMC libre à 460nm.

Des peptides synthétiques, de tailles différentes, mimant ou reproduisant le site de clivage enzymatique de type β-sécrétase ont été synthétisés pour être utilisés comme substrats dans l'étude de la caractérisation et de la spécificité des enzymes.(tableau 1)

On incube 5 µl de surnageant avec 5 µl de peptide pendant 6 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 3 µl de HCl 0,1N, et l'activité enzymatique est déterminée par mesure de la densité optique à 215 nm des fragments de clivage préalablement séparés par HPLC.

Les sites de clivage sont déduits par détermination de la séquence des fragments résultant du clivage.

Le pourcentage de clivage [ $\% = 100(A_0 - A_i)/A_0$ ] de chaque substrat peptidique a été évalué en mesurant l'absorbance à 215 nm (A) du substrat incubé en l'absence ( $A_0$ ) et en la présence ( $A_i$ ) de l'enzyme dans des conditions expérimentales identiques (temps d'incubation, pH et concentration).

Le pourcentage d'inhibition [ $\% = 100(I_0 - I_i)/I_0$ ] de chaque substrat incubé en la présence de l'enzyme a été évalué en mesurant l'absorbance à 215 nm pour un substrat peptidique ou la fluorescence à 460 nm pour le substrat Z-Val-Lys-Met-MCA en l'absence ( $I_0$ ) et en la présence ( $I_i$ ) de l'inhibiteur dans les mêmes conditions expérimentales.

Les précurseurs APP normal (APP-K<sup>595</sup>M<sup>596</sup>) et APP possédant la double mutation "suédoise" (APP-N<sup>595</sup>L<sup>596</sup>) ont été obtenus à partir d'extraits membranaires de cellules d'insectes infectées par le baculovirus contenant les gènes humains codant

pour ces précurseurs. Ces extraits membranaires, incubés avec les polypeptides de l'invention ayant une activité  $\beta$ -secrétase purifiés, sont analysés par immunoblot en utilisant l'anticorps WO-2 (Ida N. et al. (1996) J. Biol Chem 271, 22908-22914) dirigé contre les premiers acides aminés du peptide  $\beta$  amyloïde et l'anticorps monoclonal 22C11 (Boehringer Mannheim; Hilbich C. (1993) Journal of Biochemical Chemistry, 268, 26571-26577) dirigé contre le motif NH<sub>2</sub>-terminal du précurseur.

## EXEMPLES

### 10      **Exemple 1. Mise en évidence des activités enzymatiques**

Cet exemple a pour but de mettre en évidence des activités enzymatiques dans des lignées cellulaires humaines de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer.

Deux approches ont été utilisées pour la mise en évidence des protéases  
15      susceptibles d'être impliquées dans la maturation de l'APP humain.

#### **Approche Immunologique:**

A partir des 13 lignées cellulaires humaines décrites dans Matériel et  
20      Méthodes, la recherche des activités enzymatiques a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal 22C11 pour sélectionner les lignées cellulaires ayant la capacité de produire des quantités mesurables d'APP au niveau de la membrane et dans le milieu de culture cellulaire. L'anticorps monoclonal WO-2 a été utilisé pour révéler et identifier les différents sites de clivage de l'APP.

25

Les résultats sont les suivants :

- l'anticorps monoclonal 22C11 a permis de sélectionner 8 lignées cellulaires (HMCB, MRC5, Hs27, SW1088, SW1783, H9, THP1 et IM-9) sur les 13 testées au total. Pour les cellules choisies, l'analyse par immunoblot a aussi montré une différence de masse moléculaire entre l'APP membranaire (120 kDa) et les APP solubles (110-100 kDa). Ceci indique que le précurseur a subi, au niveau de sa séquence COOH-terminale, un ou plusieurs clivage(s) enzymatique(s).

- L'analyse par immunoblot des entités moléculaires générées dans les 8 lignées sélectionnées a permis de révéler et d'identifier au moyen de l'anticorps monoclonal WO-2 les différents sites de clivage de l'APP et de montrer que le précurseur du peptide A $\beta$  a subi une maturation différentielle.

Ainsi, cette approche a permis de sélectionner des lignées cellulaires ayant la capacité de produire des quantités mesurables d'APP au niveau de la membrane et dans le milieu de culture cellulaire et de montrer des clivages enzymatiques dans le précurseur du peptide A $\beta$ .

#### Substrats peptidiques:

Les peptides [KMD]APP(-5,+5) et Z-Val-Lys-Met-MCA (voir Matériel et Méthodes), dérivés de l'APP et mimant le site de clivage, ont été utilisés comme substrats pour la mise en évidence des différentes activités enzymatiques présentes dans les 8 lignées cellulaires.

Une analyse combinée (HPLC, composition en acides aminés et détermination des séquences) des fragments générés par clivage du substrat [KMD]APP(-5,+5) a été réalisée dans les lignées sélectionnées. En effet, après incubation du substrat [KMD]APP(-5,+5) avec les surnageants, les fragments générés ont été d'abord séparés par HPLC sur une colonne reverse phase RPC<sub>18</sub> (VYDAC) éluée par un gradient de 5-40% d'acétonitrile / 0.05% TFA. La séquence et/ou la composition en acides aminés de ces fragments ont été déterminés par les techniques classiques.

Les résultats de cette analyse ont permis d'identifier un clivage majoritaire au niveau de la liaison peptidique Met<sup>-1</sup>-Asp<sup>+1</sup> (correspondant au site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> dans l'APP entier) et 2 clivages minoritaires au niveau des liaisons Ser<sup>-5</sup>-Glu<sup>-4</sup> (correspondant au site Ser<sup>592</sup>-Glu<sup>593</sup> dans l'APP entier) et Ala<sup>+2</sup>-Glu<sup>+3</sup> (correspondant au site Ala<sup>598</sup>-Glu<sup>599</sup> dans l'APP entier) dans chacune des 8 lignées sélectionnées.

Une analyse du profil d'inhibition des activités enzymatiques des 8 lignées cellulaires, vis à vis du substrat fluorescent Z-Val-Lys-Met-MCA, a été également effectuée (Tableau 2).

Les résultats de cette dernière analyse ont permis de révéler l'existence d'activités enzymatiques majeures de type sérine (inhibition par l'aprotinine et le pepabloc) et métallo-protéase (inhibition par l'EDTA et le phosphoramidon) dans chacune des 8 lignées sélectionnées (Tableau 2)

#### **Exemple 2. Purification et caractérisation de l'activité $\beta$ -secrétase**

Cet exemple a pour but de décrire la purification et de mettre en évidence les caractéristiques des polypeptides de l'invention ayant une activité  $\beta$ -secrétase.

Sur la base de la sélection des 8 lignées cellulaires humaines et des résultats obtenus dans l'exemple 1, la lignée cellulaire THP-1 a été choisie, en raison de son cycle cellulaire rapide permettant d'obtenir de grandes quantités de protéines, pour être utilisée comme modèle pour la purification de l'activité  $\beta$ -secrétase recherchée selon le protocole de purification décrit dans "Matériels et Méthodes".

Une analyse de l'activité résiduelle des fractions présentant des activités protéolytiques vis-à-vis des substrats Z-Val-Lys-Met-MCA et [KMD]APP(-5,+5) a été réalisé dans le but de poursuivre la purification des polypeptides de l'invention. A chaque étape de purification, les différentes fractions ont été d'abord mises en contact avec le peptide Z-Val-Lys-Met-MCA afin d'isoler les fractions présentant des activités endoprotéolytiques. Ces dernières fractions sont ensuite testées vis-à-vis du

peptide [KMD]APP(-5,+5) afin d'isoler celles qui clivent préférentiellement ce substrat peptidique au niveau de la liaison peptidique Met<sup>-1</sup>-Asp<sup>+1</sup> (correspondant au site Met<sup>596</sup>-Asp<sup>597</sup> dans l'APP entier). Les résultats de ces travaux ont permis de mettre en évidence différentes fractions présentant des activités endoprotéolytiques, isolées à partir de surnageants des 8 cultures cellulaires sélectionnées, en utilisant en parallèle ces deux substrats.

Lors de la dernière étape du procédé de purification qui est une chromatographie d'exclusion sur colonne TSK 2000 (voir dans Matériel et Méthodes pour les caractéristiques), plusieurs fractions protéiques ont été obtenues.

La mesure de l'activité résiduelle de ces fractions vis-à-vis du peptide [KMD]APP(-5,+5) a permis d'obtenir une seule fraction ayant une activité de type  $\beta$ -secrétase. Sa caractérisation a été effectuée par la mesure du poids moléculaire en électrophorèse sur gel de polyacrilamide, la mesure du point isoélectrique, la recherche de l'activité maximale en fonction du pH ainsi que le profil d'inhibition par des inhibiteurs classiques ("Matériels et Méthodes").

L'analyse par électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrilamide 4-20% sur Phast-system (Pharmacia) en conditions dénaturantes ou normales et montre une bande de masse moléculaire voisine de 70 kDa.

Le maximum d'activité, vis-à-vis du peptide [KMD]APP(-5,+5), a été observé à des pH situés entre 7 et 8.

Le profil d'inhibition de cette fraction, vis à vis du peptide [KMD]APP(-5,+5), montre qu'il s'agit d'une sérine protéase: les pourcentages d'inhibition calculés étant respectivement de 100% pour le PMSF, 75% pour le pepablock, 25% pour le TPCK, 10% pour la benzamidine et de 0% pour l'antipapaïne.

Cet exemple décrit donc le procédé de purification ainsi que la recherche et la mise en évidence des différentes caractéristiques des polypeptides de l'invention ayant une activité  $\beta$ -secrétase.

### Exemple 3. Spécificité de l'activité $\beta$ -secrétase

Cet exemple décrit l'analyse de l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention.

Cette spécificité a été analysée en utilisant différents substrats, tel que :

- des peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du  
5 précurseur au niveau du site de clivage et décrits dans le tableau 1.
- le précurseur du peptide  $\beta$  amyloïde dans sa forme naturelle et mutée  
(mutation suédoise)

Les polypeptides de l'invention ont été mis en contact avec les différents  
substrats et le pourcentage de clivage de ces substrats a été calculé. Les résultats sont  
10 présentés dans le Tableau 3.

Pour les peptides synthétiques, l'analyse des données, regroupées dans le  
tableau 3, fait apparaître les caractéristiques concernant l'importance de quelques  
sous-sites impliqués dans la reconnaissance du substrat par cette  $\beta$  secrétase et  
permettent de conclure que :

15 1) Les sous-sites  $P_1$  et  $P_2$  sont essentiels (Partie A du tableau 3) et ce quelque  
soit la taille des substrats. Il a été remarqué que la double mutation (Lys-Met $\Rightarrow$ Asn-  
Leu) abolit totalement le clivage enzymatique.

2) Les sous-sites  $P_2$  et  $P_1$  sont interactifs ou coopératifs (Partie B du tableau 3)  
20 En effet, une simple substitution en  $P_2$  (Lys $\Rightarrow$ Asn) ou en  $P_1$  (Met $\Rightarrow$ Leu) décroît  
uniquement le taux de clivage alors que la double mutation dite "suédoise" abolit la  
reconnaissance du substrat.

La substitution du résidu en  $P_2$  (Lys $\Rightarrow$ Arg) se traduit par une différence entre les taux  
de clivage des peptides ayant Leu en  $P_1$  ([KLD]-APP(-5,+5) et [RLD]-APP(-5,+5))  
25 plus importante que celle observée pour les substrats ayant Met en  $P_1$  ([KMD]-APP(-  
5,+5) et [RMD]-APP(-5,+5))

3) La taille et/ou le volume du résidu en P<sub>1</sub> sont importants (Partie C Tabl.3):

Le taux de clivage enzymatique décroît quand la contrainte exercée sur le squelette peptidique par la chaîne latérale du sous-site P<sub>1</sub> augmente. En effet, les expériences  
5 réalisées permettent d'obtenir un classement du taux de clivage en fonction de la substitution effectuée :

[KMD]-APP(-5,+5) > [KLD]-APP(-5,+5) > [KID]-APP(-5,+5) > [KVD]-APP(-5,+5)

4) Le résidu du sous-site P'<sub>1</sub> est nécessairement Asp ou Glu (Partie D Tab.3):

10 En effet, les résultats ont montrés que la mutation de Asp par Asn ou Gln n'abolit pas le clivage du substrat; de plus, le clivage se produit au site Ala-Glu équivalent du site Met-Asp; en outre, le pseudo site Ala-Glu n'est accessible que dans le substrat naturel car, dans les mêmes conditions d'expériences, le taux de clivage du fragment APP(1,5) n'est que de 35%.

15 Ainsi, sur la base des résultats obtenus précédemment avec les polypeptides de l'invention au niveau de la spécificité de clivage de type β-sécrétase, on peut envisager l'obtention d'inhibiteurs compétitifs avec le site de clivage Met-Asp de nature peptidique, pseudo-peptidique ou non peptidique.

Pour les précurseurs d'origine membranaire du peptide β amyloïde, les  
20 produits de clivage des précurseurs complets (full-length) "normal" (APP- K<sup>595</sup>M<sup>596</sup>) et "double muté" (APP- N<sup>595</sup>L<sup>596</sup>) par les polypeptides pour lesquels l'activité β-sécrétase a mise en évidence dans les exemples 1 et 2, ont été révélés par immunoblot en utilisant les anticorps 22C11 et WO-2 (voir Matériel et Méthodes).

L'analyse des molécules par ces anticorps montre que le pourcentage de  
25 clivage du précurseur APP-KM augmente alors que celui du précurseur APP-NL reste quasiment nul, et ce quel que soit les temps d'incubation au contact de l'enzyme. En effet, les résultats présentés dans la figure 3, montrent que :



. pour les membranes bac.NL, c'est à dire les membranes incubées comportant le précurseur APP-NL, les mêmes bandes sont retrouvées quelquesoit les conditions d'expérience (colonnes 1, 2, et 3 ). Ainsi on ne constate pas de clivage par les polypeptides de l'invention .

5            pour les membranes bac.WT, c'est à dire les membranes incubées comportant le précurseur naturel APP-KM, une nouvelle bande vers 12 kDa est apparue dans la colonne 3 par comparaison aux deux autres colonnes. La colonne 1 représente les membranes non incubées sans enzyme, la colonne 2 représente les membranes incubées à 37° C sans enzyme, alors que la colonne 3 correspond aux  
10 membranes incubées à 37° C avec les polypeptides de l'invention présentant une activité de type  $\beta$ -secrétase. Il est à noter que la différence d'intensité des bandes entre les colonnes 1 et 2 des membranes bac.WT est due à la quantité de produit de départ déposé sur le gel.

          L'analyse par l'anticorps WO-2 à permis de révéler cette nouvelle bande de  
15 masse moléculaire d'environ 12 kDa et qui correspond au fragment COOH terminal issu du clivage du précurseur par la  $\beta$  secrétase au niveau de la liaison Met-Asp. Cette analyse permet de conclure au clivage du précurseur naturel APP-KM par les polypeptides de l'invention .

          Ce résultat indique donc que le précurseur APP-KM, et non le précurseur  
20 APP-NL, a été clivé de façon sélective, et confirme les données obtenues avec les peptides substrats APP de 10, 20 ou 40 acides aminés.

          En outre, cet exemple démontre que les polypeptides de l'invention isolés précédemment ont une activité de type  $\beta$ -secrétase spécifique du précurseur naturel  
25 du peptide  $\beta$  amyloïde.

Peptides	séquences en acides aminés			
		P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>
APP(1,+5)		Asp		
[KMD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	Asp
[RMD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Arg</u>	Met	Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Leu</u>	Asp
[RLD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Arg</u>	<u>Leu</u>	Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp
[NMD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Asn</u>	Met	Asp
[KID]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Ile</u>	Asp
[KVD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Val</u>	Asp
[KMN]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	<u>Asn</u>
[KMQ]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	<u>Gln</u>
[KM]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	Lys	Met	Asp
[NL]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp
[KL]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	Lys	<u>Leu</u>	Asp
[NM]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	<u>Asn</u>	Met	Asp
[KM]-APP(-20,+20)	TRPGSLTNIKTEEISEV	Lys	Met	Asp
[NL]-APP(-20,+20)	TRPGSLTNIKTEEISEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp

**Tableau 1:** tableau des peptides de différentes tailles mimant ou reproduisant le site de clivage de la  $\beta$ -secrétase, synthétisés pour être utilisés comme substrat dans la caractérisation et la spécificité enzymatique du polypeptide selon l'invention.

Inhibiteurs	Lignées cellulaires							
	HMCB	H9	Hs27	IM-9	MRC-5	THP-1	SW1088	SW1783
Standard	100	100	100	100	100	100	100	100
E64 (0.1 mM)	97	87	88	100	87	82	100	92
EDTA (3.3 mM)	<u>43</u>	<u>59</u>	<u>27</u>	<u>71</u>	<u>31</u>	<u>54</u>	<u>39</u>	92
pepstatine (10 $\mu$ M)	100	100	88	100	99	100	100	100
chymostatine (5 $\mu$ M)	95	87	<u>72</u>	97	<u>75</u>	<u>71</u>	100	100
aprotinine (0.8 $\mu$ M)	90	100	<u>40</u>	97	97	93	100	100
pefabloc (3.3 $\mu$ M)	<u>53</u>	<u>62</u>	<u>13</u>	97	<u>34</u>	<u>54</u>	91	<u>54</u>
phosphoramidon (70 $\mu$ M)	97	<u>62</u>	83	79	<u>66</u>	89	<u>70</u>	<u>76</u>
captopril (60 $\mu$ M)	96	87	97	100	100	100	100	100

**Tableau 2:** Profil d'inhibition des activités enzymatiques des 8 lignées cellulaires sélectionnées vis à vis du peptide Z-Val-Lys-Met-MCA, exprimé en pourcentage d'activité.

Peptides	clivage(%)	liaison clivée
<b>(A)-Mutation suédoise:effet de la taille</b>		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met <sup>▼</sup> Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	0	
[KM]-APP(-10,+10)	45	non déterminée
[NL]-APP(-10,+10)	0	
[KM]-APP(-20,+20)	90	non déterminée
[NL]-APP(-20,+20)	0	
<b>(B)-Mutation suédoise:importance des sous-site P<sub>2</sub> et P<sub>1</sub></b>		
[NMD]-APP(-5,+5)	45	Met <sup>▼</sup> Asp
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met <sup>▼</sup> Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	60	Leu <sup>▼</sup> Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	0	
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met <sup>▼</sup> Asp
[RMD]-APP(-5,+5)	80	Met <sup>▼</sup> Asp
[KLD]-APP(-6,+5)	60	Leu <sup>▼</sup> Asp
[RLD]-APP(-5,+5)	20	Leu <sup>▼</sup> Asp
<b>(C)-Substitution en P<sub>1</sub></b>		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met <sup>▼</sup> Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	60	Leu <sup>▼</sup> Asp
[KID]-APP(-5,+5)	40	Ile <sup>▼</sup> Asp
[KVD]-APP(-5,+5)	15	Val <sup>▼</sup> Asp
<b>(D)-Substitution en P<sub>1</sub>'</b>		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met <sup>▼</sup> Asp
[KMN]-APP(-5,+5)	70	Ala <sup>▼</sup> Glu
[KMQ]-APP(-5,+5)	80	Ala <sup>▼</sup> Glu
APP(1,+5)	35	Ala <sup>▼</sup> Glu

- 5 **Tableau 3** : résultats de l'analyse de la spécificité enzymatique du polypeptide de l'invention en utilisant des peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du précurseur APP, au niveau du site de clivage.

**Références**

- 1)-Nelson et al. (1993), **Journal of neurochemistry**, **61**, 567-577.
- 2)-Sahasrabuche et al. (1993), **Journal of Biological Chemistry**, **268**, 16699-16704
- 5 3)-Higaki et al. (1996), **Journal of Biological Chemistry**, **271**, 31885-31893
- 4)-Abraham et al. (1991), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **174**, 790-796.
- 5)-Matsumoto et al. (1994), **Biochemistry**, **33**, 3941-3948.
- 6)-Matsumoto et al. (1994), **Neurosciences Letters**, **195**, 171-174.
- 7)-Razzaboni et al. (1992), **Brain Research**, **589**, 207-216.
- 10 8)-LePage et al. (1995), **FEBS Letters**, **377**, 267-270.
- 9)-Itoh et al. (1997), **Journal of Biological Chemistry**, **272**, 22389-22392
- 10)-Papastosis et al., (1994), **Biochemistry**, **33**, 192-199.
- 11)-Thompson et al., (1995), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **213**, 66-73
- 12)-Schönlein et al., (1994), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **201**, 45-53
- 15 13)- Ida N. et al. (1996) **J. Biol Chem** **271**, 22908-22914 "Analysis of heterogeneous BA4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly-developed sensitive Western blot assay".

REVENDICATIONS

1. Polypeptide possédant une activité de type  $\beta$ -secrétase caractérisé en ce qu'il est capable de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP).

5           2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP) ne porte pas de mutation dans sa séquence protéique.

3. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide purifié à partir de cellules humaines de sujet non atteint par la maladie d'Alzheimer.

10           4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il :

- possède une masse moléculaire d'environ 70 Kda.
- possède un point isoélectrique d'environ 6.0
- est une endopeptidase de la famille des sérines protéases
- est une endopeptidase de type chymotrypsine sensible
- 15           - atteint une activité maximale à un pH compris entre 7 et 8.

5. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que son activité n'est pas dépendante d'un second substrat et/ou ligand.

6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que son activité n'est pas dépendante d'ions et de préférence de cations calciques ou magnésiques.

20           7. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable de cliver au site  $\beta$ -secrétase le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde, obtenu par reproduction des

motifs actifs du polypeptide selon les revendications 1 à 6 par des structures non peptidiques, ou non exclusivement peptidiques.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence signal.

5           9. Polypeptide selon la revendication 8 caractérisé en ce que la séquence signal est choisie parmi la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux .

10           10. Procédé de purification à partir de cellules provenant de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer, d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'on réalise les étapes suivantes :

-le surnageant de la culture cellulaire est prélevé puis concentré

-le produit de concentration est à nouveau concentré sur membrane tangentielle

15           -le produit obtenu est ensuite purifié par chromatographies successives et notamment par chromatographies d'exclusion, échangeuses d'ions et d'interaction hydrophes.

20           11. Utilisation d'une lignée cellulaire humaine représentative du Système Nerveux Central ou Périphérique et du Système Immunitaire et capable de réaliser le métabolisme normal du précurseur du peptide  $\beta$  amyloïde pour la production des polypeptides de l'invention définis selon les revendications 1 à 9. De manière préférée la lignée cellulaire sélectionnée est la lignée THP1 (ATCC TIB 202) issue de monocyte.

25           12. Utilisation d'une lignée cellulaire humaine représentative du Système Nerveux Central ou Périphérique et du Système Immunitaire et capable de réaliser le

métabolisme normal du précurseur du peptide  $\beta$  amyloïde pour la mise en évidence de composés capables d'inhiber l'interaction entre le polypeptide selon les revendications 1 à 9 et son substrat. De manière préférée la lignée cellulaire sélectionnée est la lignée THP1 (ATCC TIB 202) issue de monocyte.

- 5           13. Anticorps ou fragment d'anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 et en ce qu'il possède la faculté d'inhiber au moins en partie l'interaction entre le dit polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide tel que défini selon la revendication 1 et/ou d'intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde .
- 10           14. Procédé de mise en évidence ou d'isolement de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction du polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité dudit polypeptide, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :
- a - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes
- 15           molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée exprimant un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 9 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- b - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.
- 20           15. Ligand d'un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 9, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 14.
16. Ligand selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un antagoniste, d'un agoniste ou d'un inhibiteur du polypeptide défini selon les revendications 1 à 9.



17. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un inhibiteur du polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9.

18. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 13 et/ou un ligand selon la revendication 15.

19. Compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 13, ligands et/ou séquences nucléotidiques correspondantes définis selon la revendication 15 sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

20. Composition selon l'une des revendications 17 à 19 destinée à inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide.

21. Composition selon l'une des revendications 17 à 20 destinée à intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde et de préférence pour inhiber ou ralentir la production de peptide  $\beta$ -amyloïde.

22. Composition selon l'une des revendications 17 à 21 destinée au traitement des maladies neurodégénératives.

23. Composition selon la revendication 22 destinée au traitement de la maladie d'Alzheimer.

24. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 13 et/ou un ligand selon la revendication 15 pour inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide et/ou intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde.

25. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 13 et/ou un ligand selon la revendication 15 comme médicament, notamment pour le traitement des maladies neurodégénératives et en particulier la maladie d'Alzheimer.

5           26. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

          27. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 9 pour la mise en évidence de ligands des polypeptides et/ou de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide et/ou d'intervenir sur le métabolisme du peptide  $\beta$ -amyloïde.

10

          28. Méthode de mise en évidence de molécules qui modifient l'activité des polypeptides de l'invention, comportant les étapes suivantes :

15

- on met en contact les polypeptides de l'invention qui présente une activité de type  $\beta$ -secrétase avec une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées.

- on met en contact le mélange réactionnel décrit dans l'étape précédente avec le substrat des polypeptides de l'invention qui est préférentiellement l'APP dans sa forme naturelle

20

- on mesure l'activité  $\beta$ -secrétase sur l'APP

- on détecte et/ou on isole les molécules qui modifient l'activité  $\beta$ -secrétase des polypeptides de l'invention.

25           29. Vecteur viral ou plasmidique contenant les séquences nucléotidiques des molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention pour la transfection dans des cellules hôtes appropriées, des dites séquences et l'expression in vivo, ex-vivo et/ou in vitro des dites molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention

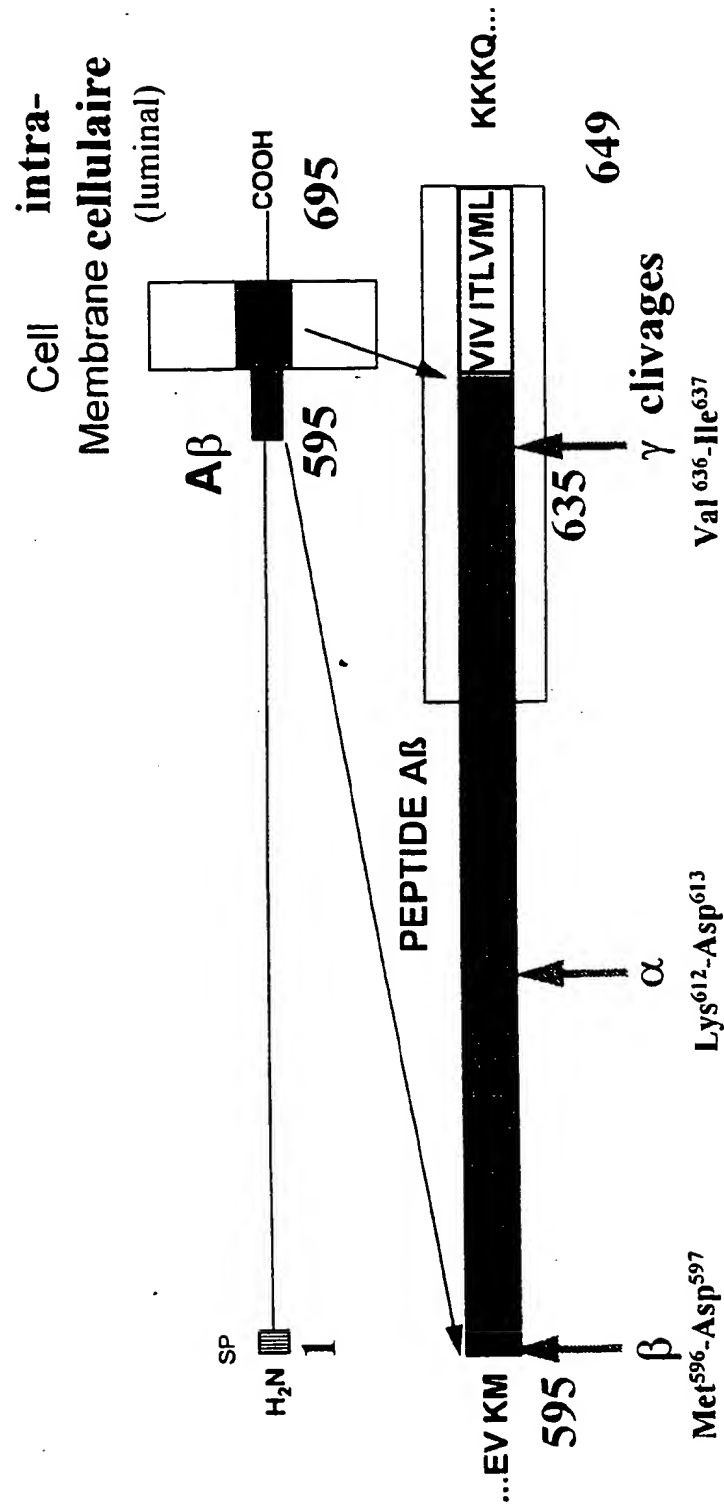


Figure 1

2/3

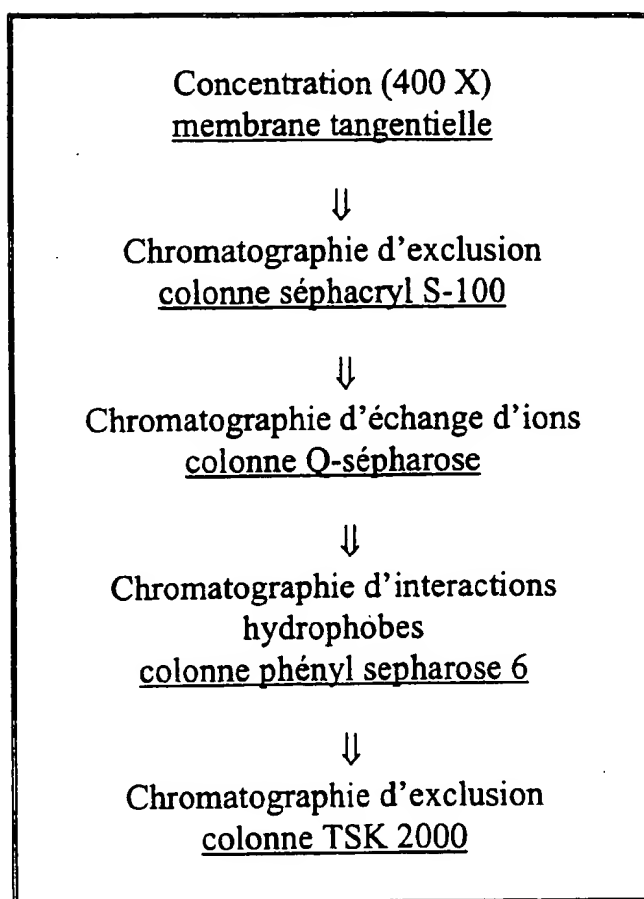


Figure 2

3/3

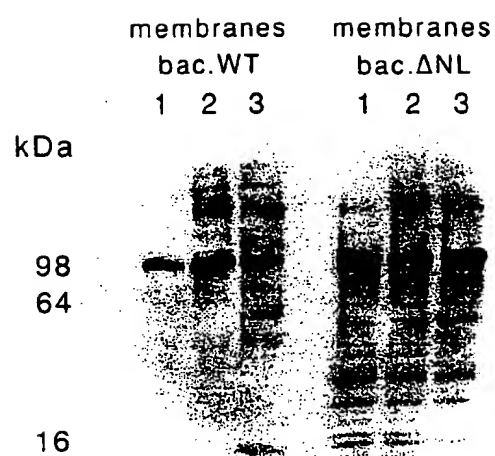


Figure 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/01326

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/12 C12N15/57 C12N9/64 C07K16/40 C12Q1/37  
A61K39/395 A61K38/48 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C07K C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 40885 A (ATHENA NEUROSCIENCES INC ;CHRYSLER SUSANNA M S (US); SINHA SUKANTO) 19 December 1996 (1996-12-19) the whole document ---	1-3, 7-10, 13-29
X	WO 92 03542 A (UNIV BOSTON) 5 March 1992 (1992-03-05) the whole document ---	1,2,13
X	WO 92 07068 A (ATHENA NEUROSCIENCES INC ;LILLY CO ELI (US)) 30 April 1992 (1992-04-30) the whole document ---	1-3, 7-10, 13-29
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 September 1999

Date of mailing of the international search report

08/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat. Application No  
PCT/FR 99/01326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NELSON R B ET AL: "CLIPSIN, A CHYMOTRYPSIN-LIKE PROTEASE IN RAT BRAIN WHICH IS IRREVERSIBLY INHIBITED BY ALPHA-1-ANTICHYMOTRYPSIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 7, 5 March 1990 (1990-03-05), pages 3836-3843, XP002011909 the whole document	1, 2, 13
X	EP 0 576 152 A (LILLY CO ELI) 29 December 1993 (1993-12-29) the whole document	1-3, 7-9, 13-16, 24-29
A	EVIN G ET AL: "ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (ABETAPP): PROTEOLYTIC PROCESSING, SECRETASES AND BETAA4 AMYLOID PRODUCTION" AMYLOID, vol. 1, no. 4, 1994, pages 263-280, XP000602976	
X	WO 91 13904 A (CEPHALON INC) 19 September 1991 (1991-09-19) page 35 - page 63	1-3, 13
X	EP 0 569 777 A (MILES INC) 18 November 1993 (1993-11-18) claims; example 10	1-3, 7-10, 13-29
X	BROWN A M ET AL: "EVALUATION OF CATHEPSINS D AND G AND EC 3.4.24.15 AS CANDIDATE BETA-SECRETASE PROTEASES USING PEPTIDE AND AMYLOID PRECURSOR PROTEIN SUBSTATES" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 66, no. 6, 1996, pages 2436-2445, XP000602767 the whole document	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / FR 99/ 01326

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Observation : Although Claims 24 and 25 (in part) relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the alleged effects of the product/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/01326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9640885 A	19-12-1996	US 5762805 A	09-06-1998
		US 5744346 A	28-04-1998
		AU 6383396 A	30-12-1996
		EP 0871720 A	21-10-1998
WO 9203542 A	05-03-1992	AU 643835 B	25-11-1993
		AU 8538791 A	17-03-1992
		CA 2088776 A	18-02-1992
		EP 0546084 A	16-06-1993
		HU 69771 A	28-09-1995
		JP 6503948 T	12-05-1994
		US 5849560 A	15-12-1998
		US 5200339 A	06-04-1993
WO 9207068 A	30-04-1992	US 5292652 A	08-03-1994
		US 5424205 A	13-06-1994
EP 0576152 A	29-12-1993	AU 3986493 A	02-12-1993
		BR 9302075 A	30-11-1993
		CA 2096911 A	29-11-1993
		CZ 9300982 A	16-02-1994
		FI 932425 A	29-11-1993
		HU 69612 A	28-09-1995
		JP 6062855 A	08-03-1994
		MX 9303082 A	30-06-1994
		NO 931889 A	29-11-1993
		PL 299053 A	21-02-1994
		US 5733768 A	31-03-1998
WO 9113904 A	19-09-1991	AU 661270 B	20-07-1995
		AU 7465491 A	10-10-1991
		CA 2077665 A	06-09-1991
		EP 0518955 A	23-12-1992
		EP 0732399 A	18-09-1996
		FI 923983 A	04-09-1992
EP 0569777 A	18-11-1993	AU 679675 B	10-07-1997
		AU 3711093 A	18-11-1993
		CA 2095888 A	12-11-1993
		JP 8268911 A	15-10-1996
		MX 9302725 A	31-08-1994
		NZ 247575 A	25-09-1996
		NZ 272218 A	27-07-1997
		WO 9513084 A	18-05-1995
		ZA 9303249 A	11-03-1994
		AU 5726494 A	04-07-1994
		CA 2151927 A	23-06-1994
		EP 0694076 A	31-01-1996
		JP 8508464 T	10-09-1996
		WO 9413319 A	23-06-1994

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den 3 Internationale No  
PCT/FR 99/01326

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/12 C12N15/57 C12N9/64 C07K16/40 C12Q1/37  
A61K39/395 A61K38/48 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N C07K C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 40885 A (ATHENA NEUROSCIENCES INC ;CHRYSLER SUSANNA M S (US); SINHA SUKANTO) 19 décembre 1996 (1996-12-19) le document en entier ---	1-3, 7-10, 13-29
X	WO 92 03542 A (UNIV BOSTON) 5 mars 1992 (1992-03-05) le document en entier ---	1,2,13
X	WO 92 07068 A (ATHENA NEUROSCIENCES INC ;LILLY CO ELI (US)) 30 avril 1992 (1992-04-30) le document en entier ---	1-3, 7-10, 13-29
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e internationale No  
PCT/FR 99/01326

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NELSON R B ET AL: "CLIPSIN, A CHYMOTRYPSIN-LIKE PROTEASE IN RAT BRAIN WHICH IS IRREVERSIBLY INHIBITED BY ALPHA-1-ANTICHYMOTRYPSIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 7, 5 mars 1990 (1990-03-05), pages 3836-3843, XP002011909 le document en entier ---	1,2,13
X	EP 0 576 152 A (LILLY CO ELI) 29 décembre 1993 (1993-12-29)  le document en entier ---	1-3,7-9, 13-16, 24-29
A	EVIN G ET AL: "ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (ABETAPP): PROTEOLYTIC PROCESSING, SECRETASES AND BETA44 AMYLOID PRODUCTION" AMYLOID, vol. 1, no. 4, 1994, pages 263-280, XP000602976 ---	
X	WO 91 13904 A (CEPHALON INC) 19 septembre 1991 (1991-09-19) page 35 - page 63 ---	1-3,13
X	EP 0 569 777 A (MILES INC) 18 novembre 1993 (1993-11-18)  revendications: exemple 10 ---	1-3, 7-10, 13-29
X	BROWN A M ET AL: "EVALUATION OF CATHEPSINS D AND G AND EC 3.4.24.15 AS CANDIDATE BETA-SECRETASE PROTEASES USING PEPTIDE AND AMYLOID PRECURSOR PROTEIN SUBSTATES" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 66, no. 6, 1996, pages 2436-2445, XP000602767 le document en entier -----	1-3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

... demande internationale n°

PCT/FR 99/01326

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportant à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que les revendications 24 et 25 (partiellement) concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportant à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>.
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 99/01326

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO 9640885 A	19-12-1996	US 5762805 A	09-06-1998
		US 5744346 A	28-04-1998
		AU 6383396 A	30-12-1996
		EP 0871720 A	21-10-1998
WO 9203542 A	05-03-1992	AU 643835 B	25-11-1993
		AU 8538791 A	17-03-1992
		CA 2088776 A	18-02-1992
		EP 0546084 A	16-06-1993
		HU 69771 A	28-09-1995
		JP 6503948 T	12-05-1994
		US 5849560 A	15-12-1998
		US 5200339 A	06-04-1993
WO 9207068 A	30-04-1992	US 5292652 A	08-03-1994
		US 5424205 A	13-06-1994
EP 0576152 A	29-12-1993	AU 3986493 A	02-12-1993
		BR 9302075 A	30-11-1993
		CA 2096911 A	29-11-1993
		CZ 9300982 A	16-02-1994
		FI 932425 A	29-11-1993
		HU 69612 A	28-09-1995
		JP 6062855 A	08-03-1994
		MX 9303082 A	30-06-1994
		NO 931889 A	29-11-1993
		PL 299053 A	21-02-1994
		US 5733768 A	31-03-1998
WO 9113904 A	19-09-1991	AU 661270 B	20-07-1995
		AU 7465491 A	10-10-1991
		CA 2077665 A	06-09-1991
		EP 0518955 A	23-12-1992
		EP 0732399 A	18-09-1996
		FI 923983 A	04-09-1992
EP 0569777 A	18-11-1993	AU 679675 B	10-07-1997
		AU 3711093 A	18-11-1993
		CA 2095888 A	12-11-1993
		JP 8268911 A	15-10-1996
		MX 9302725 A	31-08-1994
		NZ 247575 A	25-09-1996
		NZ 272218 A	27-07-1997
		WO 9513084 A	18-05-1995
		ZA 9303249 A	11-03-1994
		AU 5726494 A	04-07-1994
		CA 2151927 A	23-06-1994
		EP 0694076 A	31-01-1996
		JP 8508464 T	10-09-1996
		WO 9413319 A	23-06-1994